

УДК: 577.8

Роль сомы в формировании способности к термическому партеногенезу у тутового шелкопряда *Bombyx mori* L.

А.М.Нестеренко*Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)*

Была изучена способность к полному термическому партеногенезу у яиц, подвергшихся воздействию предваряющего теплового шока (водный прогрев при 46°C в течение 1 мин) и последующей трансплантации гонад в ходе личиночного развития. Сопоставлялась способность к искусственному термическому партеногенезу (СТП) у яиц, развивавшихся в особях, подвергшихся шоку, а также в яичниках, пересаженных после воздействия теплового шока в интактных донорах того же партеноклона (Р29). Воздействие теплового шока в ходе раннего развития в третьем личиночном возрасте вызывает резкое снижение СТП яиц. Трансплантация гонад, подвергшихся тепловому шоку, в сому интактных особей способна восстановить СТП на 20%, что указывает на преимущественно соматическое происхождение факторов, ответственных за способность к термическому партеногенезу. Предполагается, что в периоды, чувствительные к тепловому шоку, происходит формирование ряда факторов, которые в дальнейшем являются необходимыми для успешного партеногенетического развития, и их функциональность может зависеть от экспрессии генов теплового шока.

Ключевые слова: *Bombyx mori*, оогенез, партеногенез, клон, тепловой шок.

Роль соми у формуванні здатності до термічного партеногенезу в шовковичного шовкопряда *Bombyx mori* L.

А.М.Нестеренко

Вивчалася здатність до повного термічного партеногенезу в яєць, що зазнали впливу попереднього теплового шоку (водний прогрів при 46°C впродовж 1 хв) та наступної трансплантації гонад упродовж личинкового розвитку. Порівнювалась здатність до штучного термічного партеногенезу (ЗТП) в яєць, що розвивалися в особинах, які зазнали впливу теплового шоку, а також в яєчниках, що були пересажені з гусениць, що зазнали шоку, в інтактних реципієнтів того ж самого партеноклона. Було встановлено, що вплив теплового шоку у період раннього розвитку в третьому личинковому віці викликає різке зниження ЗТП в яєць партеноклона Р29. Трансплантація гонад, що зазнали теплового шоку, в сому інтактних особин здатна відновити ЗТП на 20%, що вказує на переважно соматичне походження факторів, що відповідають за здатність до термічного партеногенезу. Вважається, що у періоди, чутливі до впливу теплового шоку, формується низка факторів, які є в майбутньому необхідними для успішного партеногенетичного розвитку, та їхня функціональність залежить від генів теплового шоку.

Ключові слова: *Bombyx mori*, оогенез, партеногенез, клон, тепловий шок.

The role of soma in the formation of capability to thermal parthenogenesis in mulberry silkworm *Bombyx mori* L.

A.M.Nesterenko

The eggs that have undergone the impact of anticipating heat shock (water at 46°C during 1 min) and consequent ovary transplantation in course of larval development were studied. The rate of capability to artificial thermal parthenogenesis (CTP) of the eggs that develop in the shocked females and in the shocked ovaries, transplanted into the intact donors of parthenoclone, P29 was estimated. Heat shock, applied in the course of larval development in the third larval instar causes a sharp decline in CTP rate in the parthenoclone P29 eggs. The transplantation of the shocked gonads into the intact females can restore the CTP for about 20%. It is supposed that in periods, sensitive to heat shock, a number of factors is formed in the oocytes, that are necessary for the successful parthenogenetic development and their functionality depends on the expression of heat shock genes.

Key words: *Bombyx mori*, oogenesis, parthenogenesis, clone, heat shock.

Введение

Метод искусственного термического партеногенеза, являясь инструментом управления ранним развитием у животных, представляет большой теоретический и практический интерес. На сегодняшний день уже известен механизм термического партеногенеза, предложенный вначале Б.Л.Астауровым, но подтвержденный значительно позднее (Клименко, Спиридонова, 1979). Было установлено, что способность к искусственному термическому партеногенезу наследуема и связана с уровнем индивидуальной гетерозиготности организма (Алтухов, Клименко, 1978). Также была

установлена возможность обратимости активационных изменений в яйце после активации по Астаурову (Клименко, 1982; Klimentko, 2001). Однако молекулярные основы и уровень влияния факторов внешней среды на способность к термическому партеногенезу все еще остаются неизвестными. В поисках новых подходов нами был проведен ряд экспериментов с целью изучения влияния предваряющего теплового шока в ходе раннего развития на способность к термическому партеногенезу у тутового шелкопряда *Bombyx mori* L. В ходе предыдущих экспериментов (Нестеренко, Клименко, 2006) было показано, что тепловой шок не влияет на способность неоплодотворенных яиц к активации, однако может достоверно снизить способность к полному термическому партеногенезу в различной степени. Периодом, оказавшимся наиболее чувствительным к воздействию теплового шока, является третий личиночный возраст. В ходе настоящей работы нами была поставлена цель не только изучить влияние предваряющего теплового шока в процессе раннего развития, но и возможность коррекции нарушения этой способности, за счет трансплантации гонад, которые подверглись воздействию стресса, в сомИ интактных личинок того же клона.

Материалы и методы

В качестве модельного объекта в данном исследовании был использован диплоидный партеноклон P29 *Bombyx mori* L. (Астауров, 1968). К основным характеристикам клона относятся его высокая жизнеспособность, ряд ценных генетических маркеров и высочайший уровень способности к термическому партеногенезу (СТП): водный прогрев при 46°C в течение 18 минут дает практически 100% активацию яиц (т.е. 100% пигментированных яиц в пробе), а процент выхода при этом составляет до 95%.

Экспериментальные гусеницы выкармливались в условиях, сходных с контролем, согласно принятым зоотехническим нормам (Tazima, 1978).

В ходе онтогенеза произвольные пробы личинок (около 10–20 шт.) были отобраны из одного и того же синхронизированного материала клона P29 (группа контроля) и подвергались водному прогреву в термостате UT-10 ($t=46^{\circ}\text{C}$, время экспозиции 1 мин). Затем материал охлаждали при комнатной температуре (около 22°C) в течение 5 минут и просушивали на фильтровальной бумаге.

Экспериментальный материал выкармливался в одних условиях с контрольной группой. Контрольных личинок и куколок выдерживали в воде при комнатной температуре в течение 6 минут, хотя известно, что нахождение в воде даже в течение нескольких часов не влияет на жизнеспособность гусениц (В.В.Клименко, неопубликованные данные). Также следует учесть, что весь материал имел один генотип, так как был представлен одним клоном.

Из части гусениц, прогретых в начале III и IV личиночных возрастов, извлекались яичники и имплантировались в сомИ непрогретых личинок того же возраста согласно методу, описанному ранее (Спиридонова и др., 1987). Затем личинки, перенесшие трансплантацию, выкармливались до стадии имаго.

Полученные от имаго яйца подвергались термической активации по методу Астаурова: водный прогрев при 46°C в течение 18 минут в водном ультратермостате согласно ранее описанной технике (Астауров, 1940).

Уровень способности к термической активации оценивался по процентному отношению количества пигментированных яиц к общему количеству яиц в пробах. Параметром оценки способности к полному партеногенезу было процентное отношение количества вылупившихся личинок к общему количеству яиц в пробах пигментированных яиц.

Результаты и обсуждение

В табл. 1 приведены результаты, отражающие изменения в термоактивации и способности к полному партеногенезу после воздействия теплового шока в период с конца 2 и до середины 5 личиночного возраста. Показано, что предваряющий тепловой шок не влиял на способность неоплодотворенных яиц к термической активации – уровень способности к таковой составлял 100% во всех случаях. Выход из яиц, развившихся в женских особях, подвергавшихся воздействию теплового шока, был задержан. Уровень выхода из яиц, развившихся в интактных гонадах, составлял $98,6\pm 2,0$ %. Уровень выхода яиц, развившихся в гонадах, подвергавшихся тепловому воздействию, во всех случаях был достоверно ниже контрольного показателя и не превышал 70%. Периодом, наиболее чувствительным к тепловому шоку, был временной отрезок, соответствующий началу 3 личиночного возраста. В этой точке воздействие теплового шока приводит к снижению процента выхода до $36,67\pm 1,0$ %, т. е. уровень выхода был снижен до 60% ($p<0,01$) (см. табл. 1).

Таблица 1.

Уровень способности к термоактивации и полному партеногенезу в яйцах, развившихся в интактных особях (контроль) и в особях, подвергавшихся тепловому шоку на разных стадиях развития

Возраст, дни	Стадия развития	Активация яиц, %	Выход, %
0	Контроль	100	98,6±2,0
9	II возраст, конец	100	65,69±0,7
10	III возраст, начало	100	36,67±1,0
13	IV возраст, начало	100	40,9±1,7
20	V возраст, середина	100	66,7±2,0

Так как снижения процента активации яиц, развившихся в гонадах прогретых особей, не наблюдалось, то можно сделать вывод, что цитогенетический механизм не был нарушен. Однако тот факт, что выход из этих яиц был задержан и процент выхода был ниже нормальных значений, характерных для данного клона, указывает на нарушение комплекса веществ, ответственных за развитие яйца. Известно, что в III личиночном возрасте, для которого был характерен минимальный процент выхода, происходит активный рост фолликулярных клеток и ооцитов (Tazima, 1964, 1978). На основании этих данных можно предположить, что предваряющий тепловой шок в этот период приводит в будущем к существенным нарушениям нормального развития партеногенетического эмбриона за счет нарушения созревания ооцитов, в частности, прекращения поступления в ооцит факторов, ключевых для дальнейшего развития, либо нарушения их функциональной структуры. Природа подобных факторов в данный момент остается неизвестной, однако можно допустить, что к ним могут относиться, к примеру, белки, поставляемые материнским организмом. Учитывая тот факт, что уже при температуре, равной 42°C, происходит активация синтеза РНК малых генов теплового шока (Kimura et al., 1999), можно допустить связь семейства белков теплового шока (БТШ) с выявленными нарушениями развития.

В табл. 2 приведены результаты трансплантации гонад женских особей, подвергавшихся воздействию теплового шока, в соматически интактных реципиентов. Контролем в данном опыте были гонады реципиентов. Также в таблице приведены значения общего контроля – т.е. данные, полученные для гены тех особей, которые не подвергались никаким стрессовым воздействиям.

Таблица 2.

Уровень способности к термоактивации и полному партеногенезу в яйцах, развившихся в интактных и имплантированных гонадах

Группы		Активация, %	Выход, %
Трансплантация, III возраст	Реципиенты	100	58,42±1,4
	Доноры	100	56,5±1,91
Трансплантация, IV возраст	Реципиенты	100	55,11±2,59
	Доноры	100	50,0±2,0
Общий контроль		100	96,0±0,8

Процент выхода в гонадах реципиентов III и IV возрастов (58,42±1,4 % и 55,11±2,59 %), был ниже такового у общего контроля (96,0±0,8 %). Таким образом, можно сделать вывод, что трансплантация гонад также способна влиять на способность гонад к термическому партеногенезу у реципиентов. Процент выхода яиц, развившихся в гонадах, трансплантированных в интактные личинки после прогрева в III возрасте, был приблизительно на 20% выше показателя для яиц, развившихся в прогретых гонадах, не подвергавшихся трансплантации: 56,5±1,9 % против 36,67±1,0 % ($p<0,01$). Разница между показателями для трансплантированных гонад, прогретых в IV возрасте, и яиц, прогретых в тот же период, но не подвергавшихся трансплантации, была ниже и составляла около 10% – 50±2,0 % против 40,9±1,7 %, ($p<0,01$). Разница между показателями для трансплантированных гонад и гонад реципиентов трансплантатов была незначительной: 58,42±1,4 % против 56,5±1,91 % и 55,11±2,59 % против 50,0±2,0 %. Данные результаты указывают на то, что формирование ооцитов частично зависит от соматических факторов, а не только от белкового комплекса самих ооцитов.

Выводы

Как ясно из полученных данных, влияние предваряющего теплового шока в личиночном периоде развития не приводит в целом к снижению способности к термической активации. При воздействии в III личиночном возрасте тепловой шок приводит к задержке эмбрионального развития и снижает уровень способности к полному партеногенезу. Эти факты указывают на вероятность нарушения процесса оогенеза вследствие перенесенного стресса. Трансплантации гонад, подвергавшихся шоку, в интактную сом способны частично восстанавливать способность ооцитов к партеногенетическому развитию, что указывает на то, что факторы, влияющие на партеногенетическое развитие яиц, имеют соматическое происхождение и вырабатываются материнским организмом. Следует также учитывать, что сама трансплантация является шоком, способным влиять на дальнейшее развитие ооцитов.

Принимая во внимание вышеописанные результаты, представляется целесообразным дальнейшее изучение влияния теплового шока в течение всего периода, соответствующего III личиночному возрасту. Также предполагается изучение вклада соматических факторов и компонентов ооплазмы в процессе партеногенетического развития зародышей. Планируемые исследования могут пролить свет на один из аспектов механизма термического партеногенеза в целом и природы способности к термическому партеногенезу в частности.

Список литературы

- Алтухов Ю.П., Клименко В.В. Положительная корреляция между уровнем индивидуальной гетерозиготности и способностью к полному термическому партеногенезу у тутового шелкопряда // Доклады Академии Наук СССР. – 1978. – Т.239, №4. – С. 460–462.
- Астауров Б.Л. Искусственный партеногенез у тутового шелкопряда. – М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1940. – 240с.
- Астауров Б.Л. Цитогенетика развития тутового шелкопряда и ее экспериментальный контроль. – М.: Наука, 1968. – 103с.
- Клименко В.В. Механизм искусственного партеногенеза у тутового шелкопряда. Сообщение 3. Обратимость вторичных активационных изменений при термо- и криоактивации // Генетика. – 1982. – Т.18, №1. – С. 64–72.
- Клименко В.В., Спиридонова Т.Л. Элиминационный хроматин и искусственный партеногенез у тутового шелкопряда // Цитология. – 1979. – Т.19, №7. – С. 793–796.
- Нестеренко А.М., Клименко В.В. Влияние предваряющего теплового шока на способность к полному термопартеногенезу у тутового шелкопряда *Bombyx mori* L. // Вестник Харьковского национального университета им. В.Н.Каразина. Серия: биология. – 2006. – Т.3, №729. – С. 120–125.
- Спиридонова Т.Л., Щегельская Е.А., Клименко В.В. Трансплантация гонад у личинок Lepidoptera // Известия Академии наук Молдавской ССР. – 1987. – №2. – С. 69–71.
- Kimura R.H., Choudary P.V., Schmid C.W. Silkworm Bm1 SINE RNA increases following cellular insults // Nucleic Acid Research. – 1999. – Vol.27, №16. – P. 3380–3387.
- Klimenko V.V. Parthenogenesis and cloning in the silkworm *Bombyx mori* L.: Problems and prospects // Journal of Insect Biotechnology and sericology. – 2001. – Vol.70. – P. 155–165.
- Tazima Y. The genetics of silkworm. – London: Logos Press, Academic Press, 1964. – 253p.
- Tazima Y. The silkworm: an important laboratory tool. – Tokyo: Kodansha Ltd., 1978. – 307p.

Представлено: А.М.Марющенком

Рекомендовано до друку: А.В.Некрасовою

© А.М.Нестеренко, 2009